

PUBLICATION NUMBER : 03134527
PUBLICATION DATE : 07-06-91

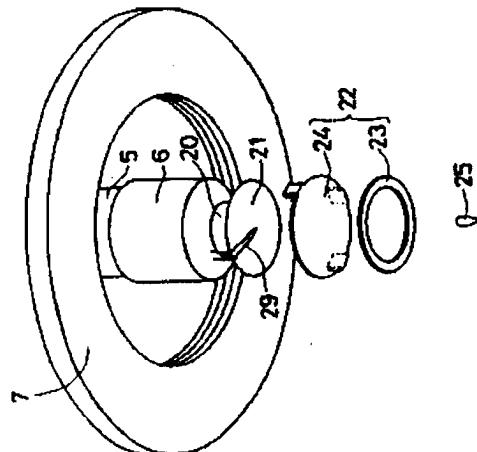
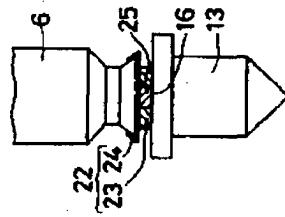
APPLICATION DATE : 19-10-89
APPLICATION NUMBER : 01273392

APPLICANT : OSAKA GAS CO LTD;

INVENTOR : TAKAE TSUTOMU;

INT.CL. : G01K 7/00 G01J 5/02 G01K 7/02
G01N 1/28

TITLE : APPARATUS FOR MEASURING
TEMPERATURE OF MINUTE AMOUNT
OF SAMPLE



ABSTRACT : PURPOSE: To make it possible to measure the temperature of a sample highly accurately by mounting the liquid-state sample on a sheet comprising a good heat conductor having a small heat capacity, providing a temperature detecting element on the opposite side of the sample, and cooling or heating the sample from the opposite side of the sheet.

CONSTITUTION: A holding member 22 which holds a sample 25 that is a biological cell is attached to a lower end surface 21 of an attaching member 6 so that the member 22 can be attached and removed. A thermocouple 29 as a temperature detecting element is provided between the sheet 24 and the lower end surface 21 of the member 6. The sheet 24 is formed of a good heat conductor having a small heat capacity, e.g. an aluminum foil and the like. In the member 22, a spacer 23 comprising a heat insulating material and the sheet 24 are fixed with a bonding agent. An upper end surface 16 of a cooling member 13 which is cooled with a cryogenetic liquefied gas e.g. liquid helium gas, is pressed to the sample 25. Thus the sample 25 is quickly cooled. Therefore, the survival rate of the sample 25 can be enhanced. The temperature of the sample 25 can be measured with the thermocouple 29 highly accurately.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio



⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A) 平3-134527

⑫ Int. CL. 5

G 01 K 7/00
G 01 J 5/02
G 01 K 7/02
G 01 N 1/28

識別記号

381 L
B
A
K

府内整理番号

7409-2F
8909-2G
7409-2F
7808-2G

⑬ 公開 平成3年(1991)6月7日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全9頁)

⑭ 発明の名称 極微量の試料の温度測定装置

⑮ 特願 平1-273392

⑯ 出願 平1(1989)10月19日

⑰ 発明者 上田 進一 大阪府大阪市中央区平野町4丁目1番2号 大阪瓦斯株式会社内

⑱ 発明者 高江 勉 大阪府大阪市中央区平野町4丁目1番2号 大阪瓦斯株式会社内

⑲ 出願人 大阪瓦斯株式会社 大阪府大阪市中央区平野町4丁目1番2号

⑳ 代理人 弁理士 西教 圭一郎 外1名

明細書

1. 発明の名称

極微量の試料の温度測定装置

2. 特許請求の範囲

(1) 液体状の試料が載置されて保持する領域を有し、熱容量の小さい熱良導体から成るシートと、このシートに接触して試料とは反対側に設けられる温度検出素子と、

試料を、シートとは反対側から冷却または加熱する手段とを含むことを特徴とする極微量の試料の温度測定装置。

(2) 異種金属の接続部分が偏平に形成され、その偏平な接続部分の一表面に、液体状の試料を載置して保持する領域を有する、そのような熱電対と、試料を、熱電対の前記接続部分とは反対側から冷却または加熱する手段とを含むことを特徴とする極微量の試料の温度測定装置。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、生体細胞などの極微量の試料の温

度を測定するための装置に関する。

従来の技術

生体細胞を、高い生存率で凍結保存するためには、その生体細胞を高速度で冷却する必要があり、その冷凍時の生体細胞の温度変化を観察するために、温度測定装置が必要になる。

本件発明者は、生体細胞である試料を高速度で冷却するために、液体ヘリウムによって純銅から成る冷却部材の表面に、極微量の試料を当接して密着する構成を提案している。この構成において、試料の温度を測定するためには、単純には、その試料に小形の熱電対を埋設しないことは想定されることが考えられるであろう。このような構成とすると、熱電対が前記冷却部材に接触する恐れがあり、したがつて試料の正確な温度を測定することができないという問題がある。また、熱電対をさらに小形化して、その熱電対の熱容量に起因した誤差を抑制する必要がある。

このような問題を解決するために、前記冷却部材に接触される試料の静電容量を測定し、この静

電容量が、生体細胞である試料に含まれている水分の液体から固体への相変化に伴つて変化することを観察し、これによつて試料の温度を測定することができる。このような構成では、生体細胞である試料の急速な過冷却を行う際の温度は、試料の水分の相変化をする温度よりももつと低い温度であるので、そのような低い温度の測定を行うことができない。

発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、極微量の試料の温度を高精度で、しかも広い温度範囲に亘つて測定することができるようとした極微量の試料の温度測定装置を提供することである。

課題を解決するための手段

本発明は、液体状の試料が載置されて保持する領域を有し、熱容量の小さい熱良導体から成るシートと、

このシートに接触して試料とは反対側に設けられる温度検出素子と、

試料を、シートとは反対側から冷却または加熱

する手段とを含むことを特徴とする極微量の試料の温度測定装置である。

また本発明は、異種金属の接続部分が偏平に形成され、その偏平な接続部分の一表面に、液体状の試料を載置して保持する領域を有する、そのような熱電対と、

試料を、熱電対の前記接続部分とは反対側から冷却または加熱する手段とを含むことを特徴とする極微量の試料の温度測定装置である。

作用

本発明に従えば、熱容量の小さい熱良導体から成るシートの予め定める領域に、液体状の試料を載置して保持し、このシートに接触して試料とは反対側に温度検出素子を設け、試料を、シートとは反対側から冷却または加熱するようにしたので、試料が冷却または加熱される際に、温度検出素子がその冷却または加熱する手段に接触することはなく、試料の温度を、シートを介して間接的に、しかも高精度で測定することができる。

また本発明に従えば、熱電対の異種金属接続部

分を偏平にし、この接続部分の予め定める領域に、液体状の試料を載置して保持し、その試料を、熱電対の前記接続部分とは反対側から冷却または加熱するようにしたので、熱電対の熱容量をできるだけ小さくし、これによつて高精度で極微量の試料の温度を測定することが可能になる。またこのような熱電対を用いることによつて、広範囲に亘つて、試料の温度を測定することができる。

この試料として、たとえば生体細胞が挙げられ、この生体細胞は、たとえば赤血球および血小板などの血液細胞、骨髄細胞、精子、卵子ならびに培養細胞などがある。極微量というのは、たとえばマイクロビペットを用いて滴下することができる程度の量未満であり得る。

実施例

第1図は、本発明の一実施例の全体の構成を示す断面図である。基台1上に立設された支柱2の上部には、案内ローラ3が設けられ、案内棒4が鉛直方向に昇降可能となつてゐる。この案内棒4の下部には取付体5が固定されており、この取付

体5の下端部には試料台である取付部材6が着脱可能に取付けられる。取付体5にはまた、強磁性材料、たとえば鉄などから成る環状の吸着部材7が固定される。

基台1上には、寒剤である極低温液化ガス、たとえば液体ヘリウム8が貯留された容器9が設けられており、この容器9には接続口10からヘリウムガスが供給される。容器9内に設けられた筒体11の下端部は液体ヘリウム8に浸漬されており、その上端部は、断熱材から成るコンテナ12の下部に開口している。このコンテナ12内には冷却部材13が配置され、この冷却部材13の外周面とコンテナ12の内周面との間の空間14から気化したヘリウムガスが放散される。

冷却部材13は、熱良導体である高純度の銅、銀などの金属であつてもよく、あるいはまたサファイアなどの材料から成つてもよく、その熱容量は生体細胞である試料25(次に述べる第2図参照)などよりも充分に大きく選ばれ、したがつて冷却部材13は常に極低温、たとえば-269℃

付近に保たれる。液体ヘリウムに代えて、液体窒素を用いることもでき、そのとき冷却部材13は-196℃付近に冷却されて保たれる。

冷却部材13の上端面16は、水平であり、鏡面仕上げが施される。

コンテナ12は取付片17によつて支柱2に固定されており、この取付片17には永久磁石片18が固定されており、これによつて吸着部材7を磁気吸着することができる。コンテナ12の上部は、蓋19によつて開閉可能とされる。

第2図は、取付部材6付近の分解斜視図である。取付部材6の下部は環状にくびれた保持部20となつておき、その下端面21は水平である。この下端面21上には、生体細胞である試料25を保持する保持部材22が着脱可能に取付けられる。

第3図は、保持部材22付近の拡大断面図である。保持部材22は、環状の合成樹脂材料などの断熱材から成るスペーサ23と、熱良導体、たとえばアルミニウムフォイルなどから成るシート24とを有し、スペーサ23とシート24とは接着

剂によつて固定される。シート24の厚みは、たとえば10μmとし、その熱容量を充分に小さく選ぶ。このシート24のスペーサ23によつて囲まれた下面是、試料25がたとえばマイクロビペットなどによつて設置されて、保持するための領域24aとなつておき、この試料は第3図において参照符25で示される。シート24の外周部には、保持片26が周方向に間隔をあけて形成されており、この保持片26を仮想線27で示す状態から矢符28のように折曲げて、取付部材6の保持部20に保持し、こうして保持部材22を取付部材6に取付けることができ、またこの保持片26を矢符28の逆方向に開いて、保持部材22を取付部材6から取外すことができる。

シート24と取付部材6の下端面21との間にには、温度検出素子としての熱電対29が介在される。このような熱電対29は、接着層43に部分的に埋込まれて取付部材6の下端面21に取付けられる。接着層43は、たとえば粘着性を有する、いわゆる合成樹脂などから成るいわゆる両面テー

アであつてもよく、熱電対29の接続部分21は接着層43から露出して、シート24に当接する。接着層43は、断熱層としての働きを兼ねており、試料25およびシート24の高速度の冷却を確実にする。この熱電対29は、熱容量が充分に小さくなるようにするために、異種金属から成る細線30から成り、その接続部分31はシート24の前記領域24aとは反対側の表面24bに接触する。こうして領域24a、したがつて試料25の温度を高精度で検出することができる。細線30は、たとえばコンスタンタンと銅とからそれぞれ成つてもよい。細線30間の熱起電力を電圧計たとえばオシロスコープ32によつて測定することによつて、試料25の温度を測定することができる。

案内棒4には、突起34が形成されており、電磁アランジヤ35によつて駆動されるストッパ36が突起34に当接している状態では、案内棒4は上方位置で保たれ、電磁ソレノイド35が励磁されることによつて、突起34とストッパ36と

が外れて、案内棒4がその自重で、取付体5および取付部材6などとともに、落下することができる。

試料25の凍結保存の手順を述べると、先ず取付部材6を取り外した状態で、取付部材6には保持部材22を固定しておき、領域24aを上方に向けた姿勢で、前述のようにマイクロビペットによつて、生体細胞である試料25を領域24aに付着して保持する。

コンテナ12は、蓋19によつて閉じたままでおき、これによつて冷却部材13は-130℃未満の極低温に保つておく。

そこで、取付部材6を取付体5に固定する。蓋19は、コンテナ12を閉じているので、冷却部材13の上端面16に空気中の酸素、窒素および水分等（たとえばCO₂）が結露して付着することを防ぐことができるとともに、液体ヘリウムの気化したガスが試料25に接触して、その試料25が不所望に冷却されるのを防ぐ。

そこで次に、蓋19を移動してコンテナ12の

上部を開き、その状態で電磁ソレノイド35を励磁して、突起34からストッパ36を外す。これによつて、案内棒4はローラ3によつて案内されて取付体5、取付部材6および保持部材22などが自重で落下する。これによつて、スペーサ23の下面23aは、第4図に明らかに示されるように、冷却部材13の上端面16に衝突し、試料25は鏡面仕上げされている上端面16に当接して圧着される。スペーサ23は、試料25が過大な圧力で圧縮されることを防いで、試料25を保護する。吸着片7は、永久磁石片18によつて磁気吸着され、こうして保持部材22のスペーサ23が冷却部材13の上端面16に衝突したときにおける上下の変動を防ぎ、試料25を上端面16に圧着させる。これによつて、試料25は10°C/分以上の冷却速度で、好ましくは10°C/分以上の冷却速度で急速に冷却される。そのため、試料25の生存率を高くすることができる。

第5図は、試料25の冷却速度と生存率との関係を示す本件発明者の実験結果を示すグラフである。

却部材13の上端面16とを離間し、ソレノイド35を消磁してストッパ36によつて突起34を支えた状態とし、この状態で、次回の試料の凍結のために、取付体5から取付部材6を取り外し、第6図で示されるように、デュワーピンまたは合成樹脂製容器などの槽3-8内に貯留されている液体窒素39内に浸漬する。この液体窒素39内で、ピンセットを用いてシート24の保止片26を前述の第3図の仮想線27で示すように開いて、試料25と一緒にとなつてある保持部材22を取り付部材6から取り外す。そこで、試料25および保持部材22を、合成樹脂製容器40内に液体窒素39内で、収納し、第7図に示されるようにして断熱保存容器41に貯留されている液体窒素42内に貯留する。こうして生体細胞を高い生存率で、-130°C未満の温度範囲で、その生体細胞の水分が結晶に転移しない状態で、保存することができる。

試料25の温度は熱電対29によつて測定され、この試料25は、熱容量の小さい熱良導体である

る。生存率は、ラインℓ1、ℓ2間の範囲内にある。本件発明に従つて、試料25の冷却速度を10°C/分以上とすることによつて、生存率を高めることができ、特にその冷却速度10°C/分以上とすることによつて生存率をほぼ100%とすることができます。

冷却部材13の上端面16は、前述のように鏡面仕上げされているので、試料25の熱伝導が極めて良好であり、しかもこの冷却部材13の熱容量は、試料25、シート24および温度検出素子29の各熱容量に比べて充分に大きいので、その上端面16の温度はほぼ一定であり、このことによつて、試料25を確実に、高速度で冷却することができ、その試料25に含まれている水分は非晶質で凍結され、たとえ氷晶が生成されても、それは極めて微細であつて、生体細胞が凍害を受けることはない。試料25と冷却部材13の上端面16との接觸状態は、たとえば2~3秒間保つてもよい。

そこで次に、案内棒4を上昇して試料25と冷

シート24の領域24aに広い面積で接觸し、したがつて試料25の温度を間接的に、高精度で測定することができる。そのため、生体細胞である試料25の急速凍結時における温度変化を観察することができる。

保持部材22のスペーサ23の厚みt(前述の第3図参照)を、たとえば15、25および50μmに変化して、熱電対29を用いてその試料25の温度の時間経過を観察することによつて、試料25の厚み方向の各部位の組織が、どの程度の冷却速度で冷却されているかを正確に知ることができ、これによつて液体ヘリウムなどの寒剤すなわち冷媒の違い、冷却部材13の材質の違い、冷却部材13の上端面16からの試料25の深さの違いによつて冷却速度に及ぼす影響を知ることができる。これによつて、最適な冷却方法を見つけることが可能になる。

水を始めとする液体は、冷却速度を上げることによつて、生成する結晶の大きさが小さくなり、やがては非晶質、すなわちアモルファス状となる。

生体細胞は、生成する氷晶の大きさが10nm未満、または非晶質状であれば、凍結解凍後も生存していると考えられており、そういう状態を確実に造りだすために本発明を実施することができる。

本件発明者の実験によれば、液体ヘリウム8を用いて、試料25を-269°C付近まで冷却したとき、その試料25は100μm以上の厚みに亘って、 6×10^4 °C/分以上の冷却速度が達成された。また、液体ヘリウム8の代りに液体窒素を用いて、試料25を-190°C付近まで冷却した場合、50μm以上の厚みに亘って、 6×10^4 °C/分以上の冷却速度が達成された。このときの試料25は、たとえば赤血球細胞である。このようにして、生体細胞を凍結することによって、含水率が低く、容易に非晶質で凍結可能な細胞はもとより、血球細胞のような高含水率の細胞においても、凍害保護剤を用いることなしに、凍結保存可能となり、熱電対29によってその温度を観察することによって、生存率の予測を行うことができる。

アによって観測され、スペーサ23の厚みも50μmとし、試料25は血液30μlであり、第9図(1)によつて得られた温度の時間変化は、時間W1が拡大されて第9図(2)で示されている。この実験によれば、冷却速度 2×10^4 °C/分が得られたことが確認された。

本発明の他の実施例として、熱電対29、44に代えて、他の構造を有する温度検出素子、たとえばサーミスタなどを用いることもまた可能である。本発明では、生体細胞の他に、食品などの液体状の試料の温度測定を行うことができる。本発明では、生体細胞などの含水試料を電子顕微鏡で観察するための前処理として、試料を急速凍結する際に、その試料の温度を測定するためにもまた、実施することができる。本発明は冷却だけでなく、加熱のためにも、実践することができる。

試料としてマイクロビペットによる液体状のものの付着保持以外に、固体試料(たとえば肉片、細胞塊)をピンセットで付着保持することもあり

きる。

第8図は、本発明の他の実施例の断面図である。この実施例では、前述の熱電対29に代えて、熱電対44が用いられる。この熱電対44は、コンスタンタンの薄膜45の表面に銅の層46を、蒸着またはスパッタリングなどの薄膜技術を用いて形成し、こうしてコンスタンタンと銅との接続部分の全体の形状を扁平にし、コンスタンタンおよび銅の素線47、48を電圧計49に接続する。層46にはスペーサ23が介在され、試料25が層46の領域46aに保持される。この層46とスペーサ23とは、試料25を保持するための保持部材としての働きを兼ねる。このような構成によれば、熱電対44の熱容量を小さくして試料25が冷却部材13の上端面16に接触したときにおける温度計測における精度の向上を、さらに図ることができる。

第9図は、第1図～第7図の実施例の本件発明者による実験結果を示すグラフである。熱電対29の熱起電力は電圧計32としてのオシロスコー

う。生体細胞の高速冷却後、それを極低温液化ガスの気化した極低温ガス雰囲気中に保持してもよい。

発明の効果

以上のように本発明によれば、極微量の温度を、高精度で、しかも、広い温度範囲に亘って、温度の測定を行うことが可能になる。また本発明では、試料としてたとえば生体細胞を凍結するに当たり、その試料の冷却速度を確認することができる。これによつて生体細胞が凍結障害がないと考えられている大きさ以下の氷晶しか生成しておらず、したがつて高い生存率で凍結されたか、または非晶質の状態では凍結していないかなどを確認することができる。

4. 図面の簡単な説明

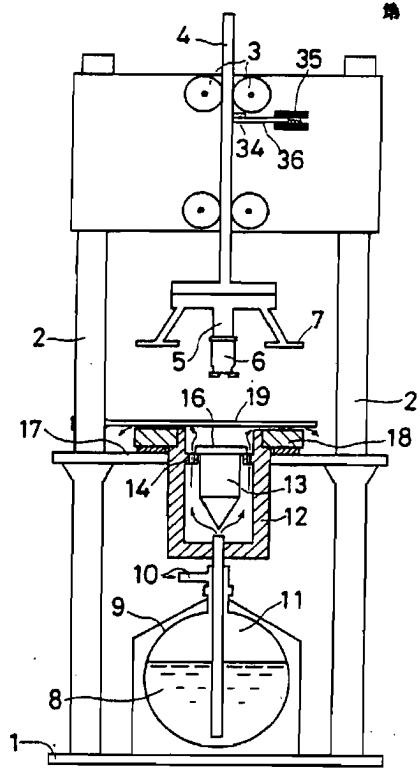
第1図は本発明の一実施例の全体の構成を示す断面図、第2図は取付部材6付近の分解斜視図、第3図は保持部材22付近の拡大断面図、第4図は試料25を冷却部材13の上端面16に圧着している状態を示す断面図、第5図は生体細胞であ

る試料25とその生存率との関係を示すグラフ、第6図は試料25の急速冷凍後に保持部材22を取り付部材6から取外す作業を示す斜視図、第7図は試料25を保存凍結した状態で保存するときの構造を示す断面図、第8図は本発明の他の実施例の断面図、第9図は第1図～第7図の実施例の本件発明者による実験結果を示すグラフである。

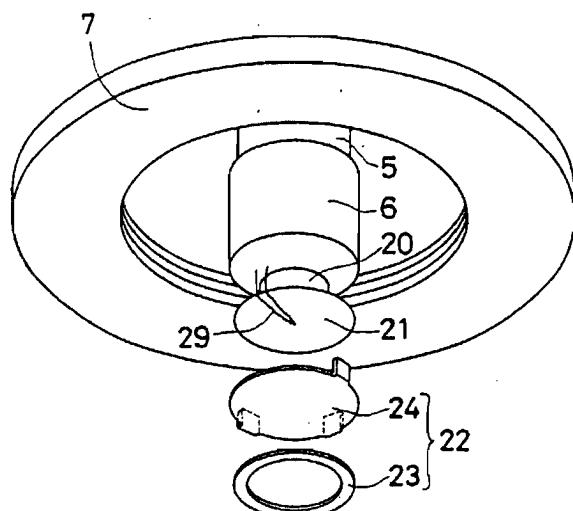
5…取付体、6…取付部材、8…液体ヘリウム、
12…コンテナ、13…冷却部材、16…上端面、
22…保持部材、23…スペーサ、24…シート、
25…試料、29、44…熱電対、32、49…
電圧計、43…接着層

代理人 弁理士 西敷 圭一郎

第1図

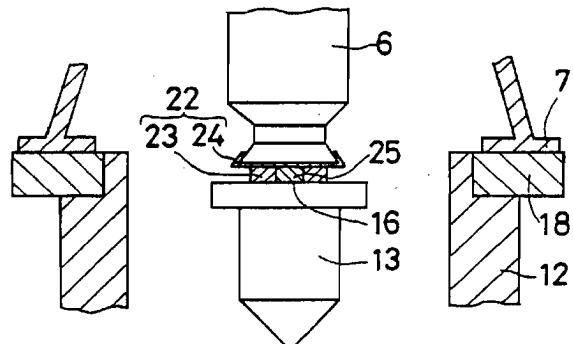


第2図

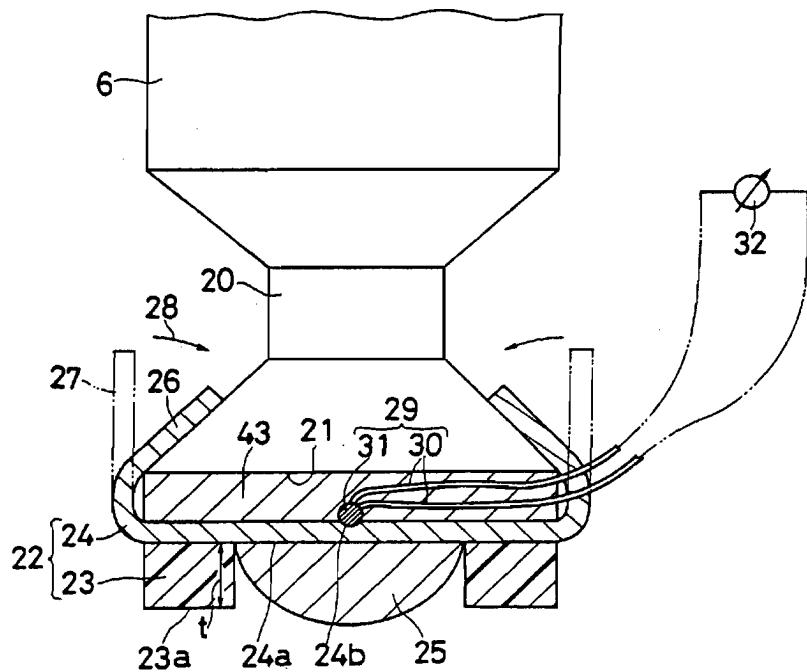


①-25

第4図

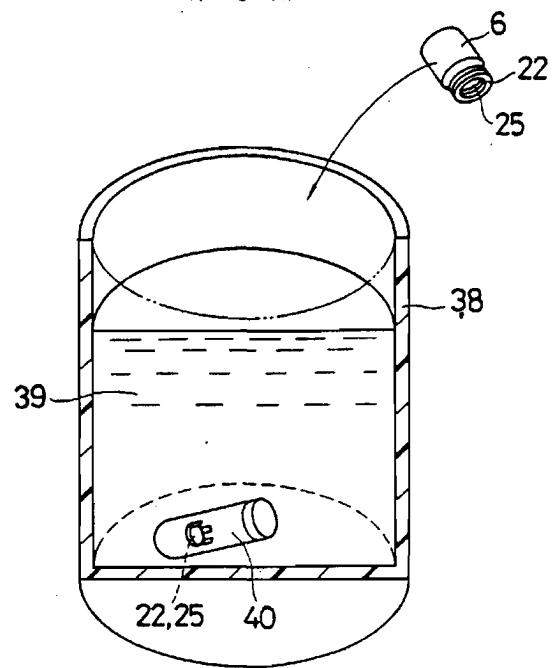
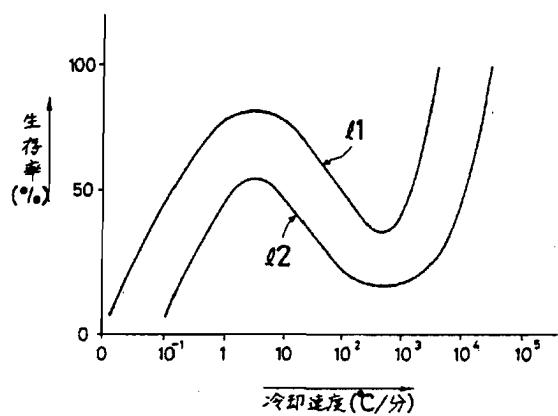


第 3 図

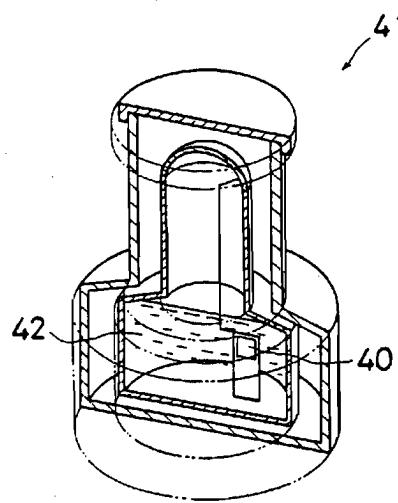


第 6 図

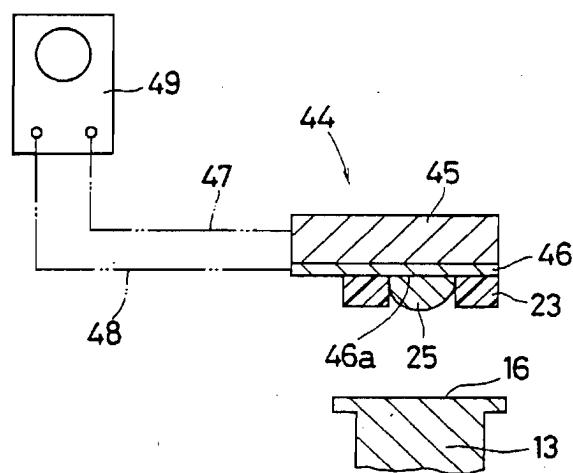
第 5 図



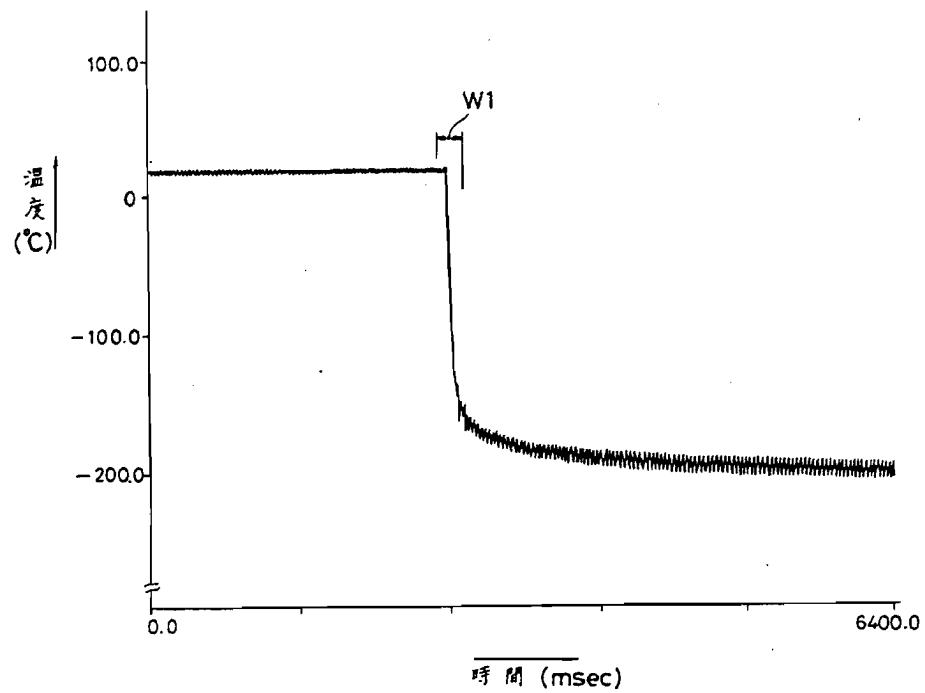
第 7 図



第 8 図



第 9 図 (1)



第9図(2)

